



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Comparación de las pruebas de inmunocromatografía empleadas en España
para la detección de anticuerpos anti-Leishmania en el perro

Comparison of the most common immunochromatography tests used in Spain
for the detection of anti-Leishmania antibodies in dogs

Autor/es

SERGIO MÁÑEZ CARBONELL

Director/es

SERGIO VILLANUEVA SAZ

Facultad de Veterinaria

2021

Contenido

RESUMEN	3
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
Ciclo biológico y respuesta inmune:	4
Cuadro clínico:	5
Diagnóstico:	6
• Diagnóstico clínico:	6
• Pruebas de confirmación de la infección:	6
Tratamiento:	11
Prevención:	12
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:	12
MATERIAL Y MÉTODOS:	13
RESULTADOS:	14
DISCUSIÓN:	18
CONCLUSIONES	21
CONCLUSIONS	21
VALORACIÓN PERSONAL	22
BIBLIOGRAFÍA	23

RESUMEN

La leishmaniosis canina es una enfermedad de transmisión vectorial producida por *Leishmania infantum*, siendo las pruebas serológicas, las principales técnicas de diagnóstico utilizadas para realizar el diagnóstico. El objetivo de esta comunicación es realizar un estudio comparativo del rendimiento diagnóstico de las seis principales pruebas de inmunocromatografía utilizadas en España (Fastest *Leishmania* (Megacor®), Uranotest *Leishmania* (Uranovet®), Uranotest *Leishmania* 2.0 (Uranovet®), SpeedLeish K (Virbac®), Witness *Leishmania* (Zoetis®) y DFV Test *Leishmania* (Divasa®)) para detectar la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en diferentes grupos de sueros de perro. El estudio se realizó con un total de 150 muestras de suero incluyendo animales de diferente edad, raza y género. La caracterización serológica de la leishmaniosis se realizó mediante la utilización de dos pruebas in-house, concretamente un ELISA y una IFI y las medidas de rendimiento diagnóstico que se calcularon para cada una de las pruebas rápidas fueron: sensibilidad, especificidad, área bajo la curva, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y ratio de probabilidad. En cuanto a los resultados, el test que mejor rendimiento obtuvo fue Fastest *Leishmania* (Megacor®) con una sensibilidad de 1,00 y una especificidad de 0,98.

ABSTRACT

Canine leishmaniosis is a vector-borne disease caused by *Leishmania infantum*, and serological tests are the main diagnostic techniques used to make the diagnosis. The aim of this communication is to perform a comparative study of the diagnostic performance of the six main immunochromatography tests used in Spain (Fastest *Leishmania* (Megacor®), Uranotest *Leishmania* (Uranovet®), Uranotest *Leishmania* 2.0 (Uranovet®), SpeedLeish K (Virbac®), Witness *Leishmania* (Zoetis®) and DFV Test *Leishmania* (Divasa®)) to detect the presence of anti-*Leishmania* antibodies in different groups of dog sera. The study was performed with a total of 150 serum samples including animals of different age, breed and gender. The serological characterization of leishmaniasis was performed by using two in-house tests, namely an ELISA and an IFA and the diagnostic performance measures that were calculated for each of the rapid tests were: sensitivity, specificity, area under the curve, positive predictive value, negative predictive value and likelihood ratio. In terms of results, the test with the best performance was Fastest *Leishmania* (Megacor®) with a sensitivity of 1.00 and a specificity of 0.98.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniosis es una enfermedad de transmisión vectorial zoonótica producida por *Leishmania infantum*, siendo el perro el principal reservorio peridoméstico para la infección en el hombre (Ramírez, 2012).

Los vectores competentes para transmitir el parásito son los flebótomos, insectos hematófagos, en el que solo las hembras son las que ingieren la sangre para reproducirse. De ellos existen dos especies distribuidas por todo el territorio peninsular, y por tanto, el riesgo de transmisión de *L. infantum* puede presentarse en cualquier área en donde se den las condiciones apropiadas (Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 2012).

Ciclo biológico y respuesta inmune:

Cuando el flebótomo ingiere sangre con macrófagos infectados con amastigotes de un individuo parasitado comienza el desarrollo del parásito en el interior de su aparato digestivo. Allí *Leishmania* se desarrolla hasta convertirse en promastigotes metacíclicos (es la forma que se desarrolla en el aparato digestivo del flebótomo). Los parásitos migran desde la región abdominal hasta la zona bucal pasando por los distintos estadios del desarrollo. La transmisión de la infección se produce cuando el flebótomo infectado se alimenta sobre un nuevo hospedador vertebrado. Los parásitos son introducidos y fagocitados por neutrófilos y que, a su vez, son fagocitados por los macrófagos. En los macrófagos se multiplican por fisión binaria en la forma amastigote. Cuando es lisado, se liberan al exterior e infectan nuevas células (Handman, 1999; Cunningham, 2002; Handman y Bullen, 2002).

En el hospedador, inicialmente se producirá una respuesta de fase aguda, seguida de una inflamación granulomatosa, que primero es local y que va evolucionando a general. Se produce una excesiva producción de anticuerpos anormales, y tiene lugar un depósito de inmunocomplejos en cualquier tipo de endotelio. Se dan también alteraciones de hemostasis, formación de auto-Anticuerpos, disminución de eritropoyesis e inmunosupresión (Ferrer et al., 1999).

No todos los perros expuestos a *L. infantum* desarrollan manifestaciones clínicas y las infecciones subclínicas son más frecuentes que la enfermedad clínica. Factores como la raza, inmunosupresión, enfermedades concomitantes, el estado nutricional, la virulencia de la cepa

de *Leishmania* y la carga parasitaria del perro infectado pueden influir en el resultado de la infección, además del sistema inmunitario y la base genética (Miro et al, 2008).

Se pueden desarrollar dos tipos de respuesta inmune mediada por los linfocitos T, una respuesta celular dirigida por los Th1 asociada a la inmunidad protectora y otra respuesta humoral dirigida por los Th2 ligado a la susceptibilidad o progresión de la enfermedad. Las interacciones entre ambos tipos de respuesta son muy complejas y se observa que hay un balance entre ellas (Alvar et al, 2004). Una apropiada respuesta inmune es esencial para controlar la infección. La inmunidad protectora es producida por linfocitos T CD4⁺, tipo Th1 que liberan citocinas (γ -interferon, IL-2, TNF- α) que inducen la actividad anti-*Leishmania* de macrófagos produciendo óxido nítrico para que destruyan al parásito (Barbieri, 2006; Carrillo et al., 2009).

Perros con una respuesta inmune adecuada generalmente presentan una respuesta humoral pobre, mientras que los enfermos y/o susceptibles presentan un aumento de esta respuesta y una reducción de la respuesta celular con mezcla de respuesta de citocinas dependientes de Th1 y Th2 (Barbieri, 2006; Carrillo et al., 2009).

Cuadro clínico:

Existen una amplia variedad de manifestaciones clínicas debido a diferentes tipos de respuesta inmune (Kaszak, Planellas y Kaszak, 2015). Puede presentar cuadros inespecíficos como linfadenopatía periférica donde el ganglio poplíteo es el más accesible, apatía, emaciación, atrofia muscular y palidez de las mucosas.

Entre los trastornos de la piel, las manifestaciones más frecuentes son: dermatitis exfoliativa con o sin alopecia sobre todo alrededor de los ojos y en la zona dorsal de la trufa, dermatitis erosiva-ulcerativa, dermatitis nodular, pápulo-nodular o pustular. Otras presentaciones clínicas comunes son lesiones renales, articulares y oculares como blefaritis, uveítis anterior, queratoconjuntivitis, lesiones que pueden conducir a glaucoma o a la panoftalmia y, por tanto, incluso a la ceguera (Ortega, 2016). En algunas ocasiones puede aparecer cojera, epistaxis, problemas vasculares o neurológicos y onicogrifosis. Sin embargo, el fallo renal es la principal causa de mortalidad.

Diagnóstico:

Las pruebas de diagnóstico con elevado rendimiento diagnóstico son esenciales para la detección de la infección tanto en perros sintomáticos como asintomáticos (Miró et al., 2008). Diferentes aproximaciones pueden llevarse a cabo, incluyéndose la demostración del ADN del parásito en sangre u otros tejidos y la detección de anticuerpos anti-*Leishmania* específicos en suero como inmunofluorescencia indirecta (IFI), ELISA o test de aglutinación directa (DAT) y, finalmente, la visualización de la presencia directa del parásito mediante las pruebas parasitológicas (Miró et al., 2008).

Para el diagnóstico de la enfermedad, se recomienda combinar el examen clínico-patológico con una confirmación laboratorial (Ortega, 2016).

- Diagnóstico clínico:

El diagnóstico clínico es complejo en *Leishmania*, por lo que es importante realizar una buena anamnesis, un examen físico completo y pruebas de laboratorio de rutina como hemograma, bioquímica, urianálisis, ecografías o radiografías para aumentar el índice de sospecha de esta enfermedad (Solano-Gallego y Baneth, 2008).

En el hemograma se puede observar anemia poco o no regenerativa debido a que la leishmaniosis es una enfermedad crónica, leucocitosis neutrofílica y monocítica con linfopenia y eosinopenia y trombocitopenia. En la bioquímica se pueden encontrar hallazgos de hiperproteinemia debido a una hipergammaglobulinemia, hipoalbuminemia, alteración en el ratio albúmina/globulina, azotemia y un aumento de los enzimas hepáticos. En cuanto al análisis de orina se pueden observar orina isostenúrica o hipostenúrica; en caso de daño renal es posible detectar proteinuria o hematuria (Ferrer y Roura, 2010).

- Pruebas de confirmación de la infección:

- Métodos parasitológicos

-Examen microscópico:

Se pueden observar amastigotes de *Leishmania* directamente al microscopio en frotis teñidos de órganos y tejidos infectados como linfonodos, médula ósea, piel o sangre periférica. El problema es que la mayoría de estas muestras no son útiles para detectar el parásito en perros asintomáticos (Alvar et al., 2004).

-Histopatología:

Mediante la tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) en órganos y tejidos infectados se puede detectar la presencia del parásito, aunque se requiere de bastante tiempo para identificar amastigotes (Xavier et al, 2006).

-Inmunohistoquímica (IHQ):

Es una herramienta que se basa en la detección de antígenos de *Leishmania* a través de anticuerpos primarios de suero de perro infectado, o mediante anticuerpos monoclonales o policlonales. (Tafari et al., 2004). Se puede utilizar como una herramienta complementaria para confirmar el diagnóstico a la HE, especialmente en órganos que no presentan una alta carga parasitaria (Maia y Campino, 2008).

-Cultivo in vitro del parásito:

El cultivo in vitro de diferentes tejidos puede mejorar la sensibilidad de la detección de parásitos, sin embargo, no todos los tejidos y órganos tienen la misma carga parasitaria. Hoy en día, se utilizan menos por sus inconvenientes como el retraso en el resultado, la susceptibilidad a la contaminación microbiológica o la dependencia de la carga parasitaria (Maia y Campino, 2008).

- Métodos moleculares:

-Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Los métodos basados en la PCR presentan una elevada sensibilidad y especificidad para determinar la presencia e identificar al parásito, no solo en casos activos, sino también para monitorizar la cura parasitológica (Maia y Campino, 2008). En esta técnica se amplifican fragmentos de ADN del parásito, que aparecen repetidos en múltiples copias del parásito,

alcanzando una sensibilidad del 95-100% (Moreira et al., 2007). Se puede realizar dicha técnica en cualquier tipo de muestra biológica (Maia y Campino, 2008; Manna et al., 2008).

A pesar de su gran sensibilidad, un único resultado negativo de la PCR en un perro con sospecha clínica no es suficiente para descartar la infección ya que estudios que evalúan la PCR de diferentes tejidos han mostrado resultados variables y, a veces, contradictorios (Baneth y Aroch, 2008). Esto puede ser explicado debido a la distribución heterogénea de los parásitos en cada tejido o por la carga órgano-parásito asociada con el tropismo de la cepa de *Leishmania* y la respuesta inmune local. Además, la eficacia de la técnica dependerá de diferentes factores como cebadores seleccionados, el número de copias realizadas, el método de extracción del ADN, el material biológico utilizado o el protocolo que se sigue de la técnica (Alvar et al., 2004; Cortes et al., 2004; Baneth and Aroch, 2008).

-Real-Time PCR (qPCR):

La PCR cuantitativa en tiempo real es una técnica avanzada que permite la monitorización continuada de las secuencias amplificadas de ADN específicas conforme se produce la reacción. Las ventajas que presenta con respecto a la PCR convencional es que puede detectar cargas parasitarias extremadamente bajas, reduce el tiempo de la prueba, tiene menor riesgo de contaminación y permite la cuantificación de las cargas de *Leishmania* en tejidos de perros infectados, lo cual es importante para el diagnóstico y el seguimiento durante el tratamiento de la enfermedad (Rodríguez-Cortés et al., 2007).

Es importante destacar que la información proporcionada por la PCR no debe separarse de las evaluaciones clínico-patológicas y serológicas. Todos estos deben combinarse para una evaluación completa (Solano-Gallego et al., 2009).

○ Métodos indirectos

Se basan en la detección de anticuerpos específicos producto de la respuesta inmunitaria humoral del animal frente al agente infeccioso. Aunque la producción de anticuerpos es baja en la fase inicial y tardía o en infecciones asintomáticas, los perros infectados suelen desarrollar títulos de anticuerpos que aumentan gradualmente con el tiempo (Maia y Campino, 2008). Cabe destacar que la presencia de anticuerpos no implica que el animal desarrolle signos clínicos y no todos los animales infectados presentan anticuerpos.

La muestra más habitual suele ser suero, ya que las concentraciones de anticuerpos antileishmania específicos se correlacionan con la parasitemia y con el estado clínico del animal (Rodríguez-Cortés et al., 2007). El uso de diferentes antígenos, la variedad de procedimientos y la selección de diferentes diluciones de corte ha dado lugar a resultados inconsistentes que dificultan la estandarización (Maia y Campino, 2008).

Existe una amplia gama de técnicas serológicas, entre las que destacan los test rápidos inmunocromatográficos, la aglutinación directa (DAT), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) (Ortega, 2016).

-Pruebas rápidas de inmunocromatografía:

Los test rápidos son una herramienta cualitativa que se utilizan como un primer paso importante en algoritmos de diagnósticos, permitiendo obtener resultados en un periodo corto de tiempo. Fundamentalmente se basan en el antígeno rk39, disponible en el mercado en la forma de tiras de papel de nitrocelulosa impregnadas del antígeno (Mettler et al., 2005; Otranto et al., 2005).

Numerosos test rápidos están disponibles para detectar anticuerpos en los perros, sin embargo, estos test muestran alta especificidad (probabilidad de dar como negativo los casos realmente sanos) y sensibilidad variable (probabilidad de dar como caso positivo los casos realmente enfermos) (Rodríguez-Cortés, 2013).

-Inmunofluorescencia indirecta (IFI):

La IFI se considera la prueba estándar de diagnóstico serológico. Esta prueba utiliza el cuerpo entero del parásito como antígeno y es útil en estudios epidemiológicos, en la práctica clínica y en el seguimiento del tratamiento (Alvar et al., 2004).

La limitación de esta prueba es la subjetividad de la lectura, la existencia de diferentes criterios para establecer el límite de positividad de la muestra relacionado, a menudo, con los diferentes aislamientos de *Leishmania* utilizados, necesidad de un microscopio de fluorescencia y que, al ser una técnica laboriosa, es poco práctica cuando se procesa un gran número de muestras (Ortega, 2016).

Las muestras en las que los parásitos presentan una fluorescencia verde homogénea se consideran positivas mientras que aquellas en las que se observa una coloración roja mate se consideran negativas (Maia y Campino, 2008).

-Aglutinación directa (DAT):

El DAT es una técnica serológica cuantitativa cuyo principio es el fenómeno de aglutinación donde los anticuerpos del suero del paciente reaccionan de manera específica con el antígeno. Se considera positiva cuando se ha observado a simple vista el fenómeno de aglutinación (Schallig et al., 2002). El método utiliza promastigotes enteros teñidos en forma de suspensión o congelados en polvo para la detección de la respuesta humoral frente a los antígenos de superficie de *Leishmania*. Es económica y simple de realizar, lo que la hace ideal tanto para el uso en el campo como en laboratorio.

Una de las limitaciones del DAT es el tiempo de incubación que es relativamente largo (18h) y el hecho de que se deben realizar diluciones seriadas de sangre o suero, haciendo que sea laboriosa y no adecuada para el cribado de un gran número de muestras (Maia y Campino, 2008).

Existe una variante del DAT que es el test de aglutinación rápida de cribado (FAST), en el que combina una mayor concentración del parásito con un volumen de ensayo menor, requiriendo una dilución única y una lectura en menor tiempo. Es muy útil para estudiar poblaciones grandes de perros (Schallig et al., 2002).

-Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA):

Es un test específico donde se pueden utilizar diversos antígenos que se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo a su naturaleza: extracto de amastigotes solubles o completos, proteínas recombinantes y proteínas purificadas. La sensibilidad y especificidad del ELISA varía dependiendo de qué antígeno se utilice; por ello su sensibilidad puede oscilar entre un 80 y 99,5% y su especificidad entre un 81 y un 100%. El uso de amastigotes como antígeno parece ser más sensible que el antígeno de promastigote para la detección de anticuerpos tanto en perros enfermos como subclínicos (Solano-Gallego et al., 2014).

Sus principales ventajas son la automatización, permitiendo procesar un gran número de muestras simultáneamente y la lectura espectrofotométrica objetiva (Hernández, 2016).

Tratamiento:

A pesar de existir varias opciones terapéuticas disponibles, la curación parasitológica del animal no ocurre, mientras que los perros en tratamiento sí que se observa la curación clínica. (Noli y Auxilia, 2005).

La respuesta clínica al tratamiento puede variar dependiendo del estado clínico inicial del animal y de la respuesta específica que al tratamiento aplicado (Miró et al., 2014).

-Antimoniales pentavalentes

Existen dos formulaciones comerciales: Glucantime® y Antishmania®. Se pueden utilizar como monoterapia o en combinación con otros fármacos para potenciar su efecto y conseguir efecto sinérgico (Oliva et al., 2004). La dosis en monoterapia es 75-100mg/kg por vía subcutánea durante 4-6 semanas. Desde un punto de vista de dosificación es necesario repartir la dosis diaria en dos tomas.

-Miltefosina

Originariamente se desarrolló como agente antineoplásico, pero se observó que presentaba una fuerte actividad antileishmania tanto frente a los promastigotes como a los amastigotes de varias especies de *Leishmania*. Este fármaco se puede administrar vía oral con una dosis de 2 mg/kg durante 30 días (Reguera et al., 2016; Hernández, 2016; Noli y Saridomichelakis, 2014).

Cuando se utiliza como monoterapia, a pesar de poseer una eficacia buena, se ha observado en algunos casos un incremento significativo en la carga parasitaria 6 meses tras el tratamiento. Actualmente, se considera la combinación de miltefosina con alopurinol la segunda elección para el tratamiento de la *Leishmania* (Woerly et al., 2009; Miró, 2013; Bianciardi et al., 2009).

-Alopurinol y combinaciones:

Se trata de un fármaco que se administra por vía oral y que se puede utilizar como monoterapia o, más comúnmente, combinado con otros fármacos de primera línea que potencian su efecto parasistático. La carga de parásito disminuye con poca toxicidad para el huésped (Baneth y Shaw, 2002; Torres et al., 2011).

La dosis de alopurinol más habitual es de 10-20 mg/kg/día por vía oral repartida en dos tomas como terapia de mantenimiento a largo plazo, entre 6 y 18 meses.

La combinación de antimoniato de meglumina y alopurinol posee una acción sinérgica y es considerada el tratamiento de elección, observándose una mayor eficacia y permitiendo administrar dosis inferiores y durante menos tiempo, favoreciendo la tasa de curación y que las recaídas ocurran más tarde y espaciadas (Hernández, 2016).

Prevención:

Actualmente no hay ninguna medida preventiva efectiva al 100%, pero el uso tópico de insecticidas o repelentes (piretroides) de forma regular en el perro ha evidenciado tener una eficacia elevada para la reducción de la infección por *Leishmania* (Hernández, 2016).

En primer lugar, es importante evitar la picadura de los flebótomos a los perros. Para ello, es recomendable restringir las salidas durante la época de mayor actividad del vector, que es desde el atardecer hasta el amanecer. También evitar los hábitats más favorables para los flebótomos y el uso de insecticidas ambientales y tópicos (pulverizaciones, pipetas y collares) ayudan a prevenir la picadura del vector (Alexander y Maroli, 2003; Hernández, 2016).

En las últimas décadas se han realizado numerosos progresos para seleccionar antígenos de *Leishmania* como potenciales candidatos vacunales y debe considerarse un paso importante hacia el control de la leishmaniosis. Sin embargo, todas las vacunas comercializadas contra CanL recomiendan la aplicación simultánea de insecticidas tópicos en los individuos vacunados ya que los niveles de protección conferidos por la inmunización sola no se consideran satisfactorios en la prevención de la infección por *L. infantum* (Velez y Gállego, 2020).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS:

El diagnóstico específico de *L. infantum* es complejo ya que hay múltiples manifestaciones clínicas. A pesar de que existen numerosas técnicas de diagnóstico, una de las técnicas que más se utiliza en clínica de manera rutinaria es el uso de test rápidos inmunocromatográficos, por lo que el objetivo de esta comunicación es realizar un estudio comparativo del rendimiento

diagnóstico de las seis principales pruebas de inmunocromatografía utilizadas en España para detectar la presencia de anticuerpos anti-*Leishmania* en perros.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Muestras incluidas:

El estudio se realizó con un total de 150 muestras de suero de perro de diferente edad, raza y género, los cuales se clasificaron en diferentes grupos: perros expuestos (n=33), perros seronegativos sanos (n=21), perros clínicamente enfermos con niveles moderados de anticuerpos (n=39), perros clínicamente enfermos con niveles elevados de anticuerpos (n=37) y, finalmente, perros con otras enfermedades para analizar el fenómeno de reacción cruzada (n=20). Para la clasificación de las muestras en los distintos grupos de animales se basó en la información obtenida de las diferentes actuaciones clínicas realizadas, incluyendo examen físico, alteraciones de laboratorio y un resultado serológico para las dos pruebas serológicas *in-house*. Es importante comentar que estas muestras son muestras residuales por lo que no es necesario la aprobación del estudio por parte del comité de experimentación animal.

Caracterización serológica:

La caracterización serológica de la leishmaniosis se realizó mediante la utilización de dos pruebas *in-house*, concretamente un ELISA y una IFI. La prueba ELISA se realizó siguiendo el material y métodos descritos por Basurco *et al.* (2020), mientras que la prueba IFI se realizó siguiendo el material y métodos descrito por Alcover *et al.*, (2021), adaptado a la especie canina. Todas las muestras presentaban resultados concordantes para ambas pruebas de tipo *in-house*.

Pruebas realizadas:

Las pruebas rápidas de inmunocromatografía analizadas fueron Fastest *Leishmania* (Megacor®), Uranotest *Leishmania* (Uranovet®), Uranotest *Leishmania* 2.0 (Uranovet®), SpeedLeish K (Virbac®), Witness *Leishmania* (Zoetis®) y DFV Test *Leishmania* (Divasa®).

Todos las pruebas se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante y se tuvo en cuenta la sensibilidad y especificidad según lo que indica el fabricante de cada uno de los test, adjuntadas a continuación:

Test	Sensibilidad	Especificidad	Referencia
Uranotest <i>Leishmania</i>	0,967	0,988	(Uranotest, s.f)
Uranotest <i>Leishmania</i> 2.0	En estudio	En estudio	
SpeedLeish K	0,98	1,00	(Virbac, s.f)
Witness <i>Leishmania</i>	0,65-0,96	1,00	(Zoetis, s.f)
DFV Test <i>Leishmania</i>	0,93	0,95	(Divasa-Farmavic, s.f)
Fastest <i>Leishmania</i>	0,99	0,98	(Megacor Diagnostik, s.f)

Análisis estadístico:

Las medidas de rendimiento diagnóstico que se calcularon para cada una de las pruebas rápidas fueron: sensibilidad, especificidad, el área bajo la curva, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y ratio de probabilidad. Para ello se utilizó el programa estadístico SPSS versión 18.

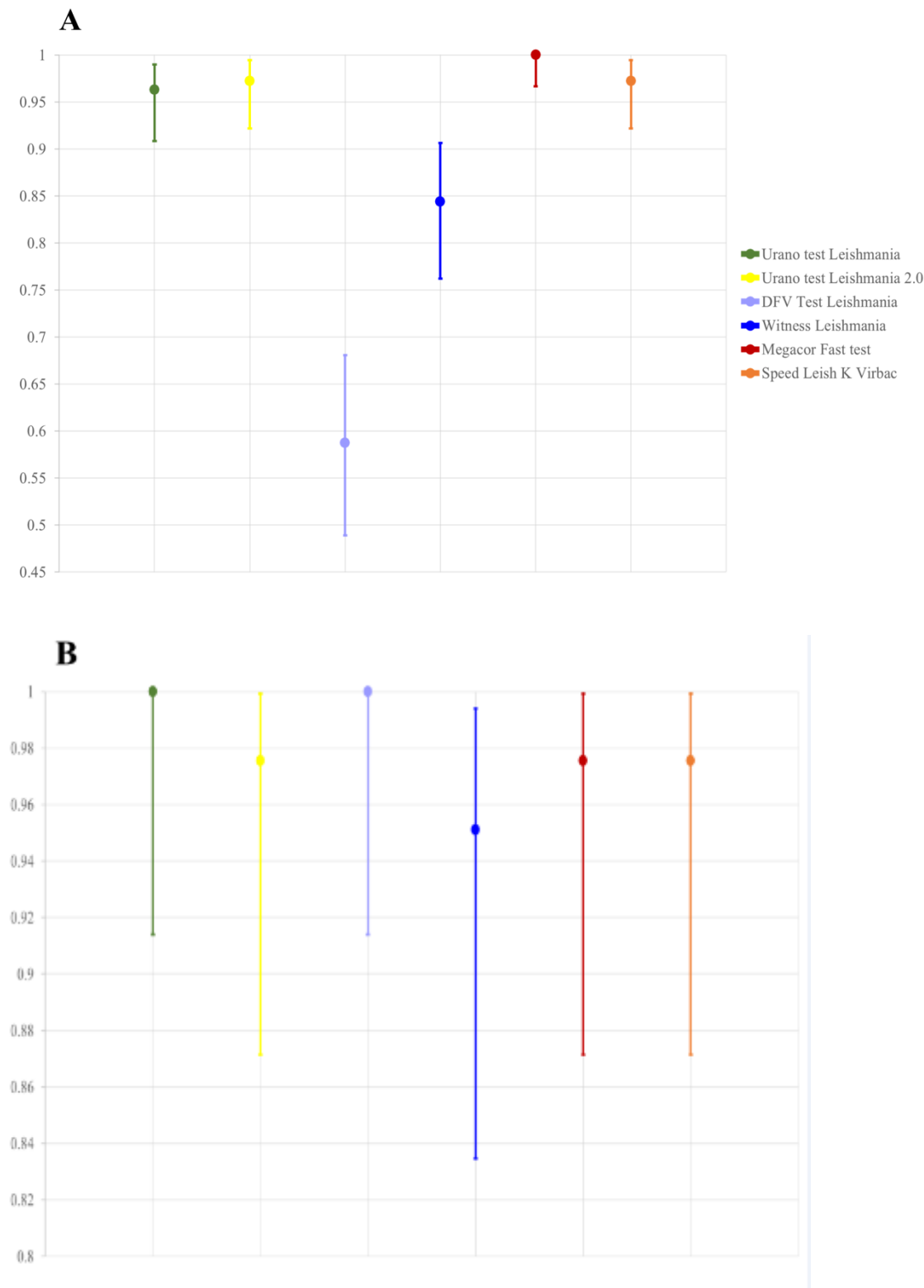
RESULTADOS:

Las pruebas de inmunocromatografía rápida mostraron valores de sensibilidad variables, entre 0,73 y 1,00, siendo DFV Test *Leishmania* (0,73) y Witness *Leishmania* (0,84) las pruebas con más bajo rendimiento frente a las demás evaluadas: Uranotest *Leishmania* 2.0 (0,97), SpeedLeish K (0,97), Uranotest *Leishmania* (0,96) y Fastest *Leishmania* (1,00) (**Figura 1A**) (**Tabla 1**).

Respecto a la especificidad, el rendimiento mostrado por las diferentes pruebas fue similar, con valores entre 0,95 (Witness *Leishmania*) y 1,00 (Uranotest *Leishmania* y DFV Test

Leishmania), siendo la especificidad para las restantes pruebas de 0,98 (Tabla 1). Se destaca que algunos LR no pudieron ser calculados debido a la ausencia de falsos negativos y falsos positivos en las pruebas (**Figura 1B**) (Tabla 1).

Figura 1: Sensibilidad y Especificidad de los test evaluados



En cuanto al valor predictivo positivo (PPV) (probabilidad condicional de tener la enfermedad, dado que el test resultó positivo) los resultados fueron muy parecidos, rondando valores entorno a 1,00, siendo Witness *Leishmania* el que obtuvo un valor menor (0,98). En todos los test evaluados, el número de falsos positivos fue muy bajo. Por otro lado, en el valor predictivo negativo (NPV) (probabilidad condicional de tener la enfermedad, dado que el test resultó negativo) hubo variabilidad de resultados, donde el menor resultado fue DFV Test *Leishmania* (0,48), seguido de Witness *Leishmania* (0,70) y Megacor Fast test obtuvo el mejor resultado (1,00). Esto es debido a que en DFV Test *Leishmania* y Witness *Leishmania* han aparecido muchos falsos negativos (**Tabla 2**) (Bravo-Grau y Cruz, 2015).

Tabla 1: Rendimiento de ICTs rK39 en muestras caninas de España

Test	Se	Sp	PPV	NPV	LR+	LR-
DFV Test <i>Leishmania</i>	0,73 (0,65 – 0,8)	1,00 (0,91 – 1,00)	1,00 (0,94 – 1,00)	0,48 (0,37 – 0,59)	NA	0,41 (0,33 – 0,52)
Megacor Fast test	1,00 (0,97 – 1,00)	0,98 (0,87 – 1)	0,99 (0,95 – 1,00)	1,00 (0,91 – 1,00)	41 (5,9 – 284,1)	NA
Speed Leish K Virbac	0,97 (0,92 – 0,99)	0,98 (0,87 – 1)	0,99 (0,95 – 1,00)	0,93 (0,81 – 0,98)	39,9 (5,8 – 276,4)	0,02 (0,009 – 0,09)
Urano test <i>Leishmania</i> 2.0	0,97 (0,92 – 0,99)	0,98 (0,87 – 1,00)	0,99 (0,95 – 1,00)	0,93 (0,81 – 0,98)	39,9 (5,8 – 276,4)	0,02 (0,009 – 0,09)
Urano test <i>Leishmania</i>	0,96 (0,91 – 0,99)	1,00 (0,91 – 1,00)	1,00 (0,96 – 1,00)	0,91 (0,79 – 0,98)	NA	0,04 (0,014 – 0,096)
Witness <i>Leishmania</i>	0,84 (0,76 – 0,91)	0,95 (0,83 – 0,99)	0,98 (0,92 – 1,00)	0,70 (0,56 – 0,81)	17,3 (4,46 – 67)	0,16 (0,1 – 0,26)

Se: Sensibilidad, Sp: Especificidad, PPV: Valor predictivo positivo, NPV: Valor predictivo negativo, LR: ratio de probabilidad, NA: No aplicable.

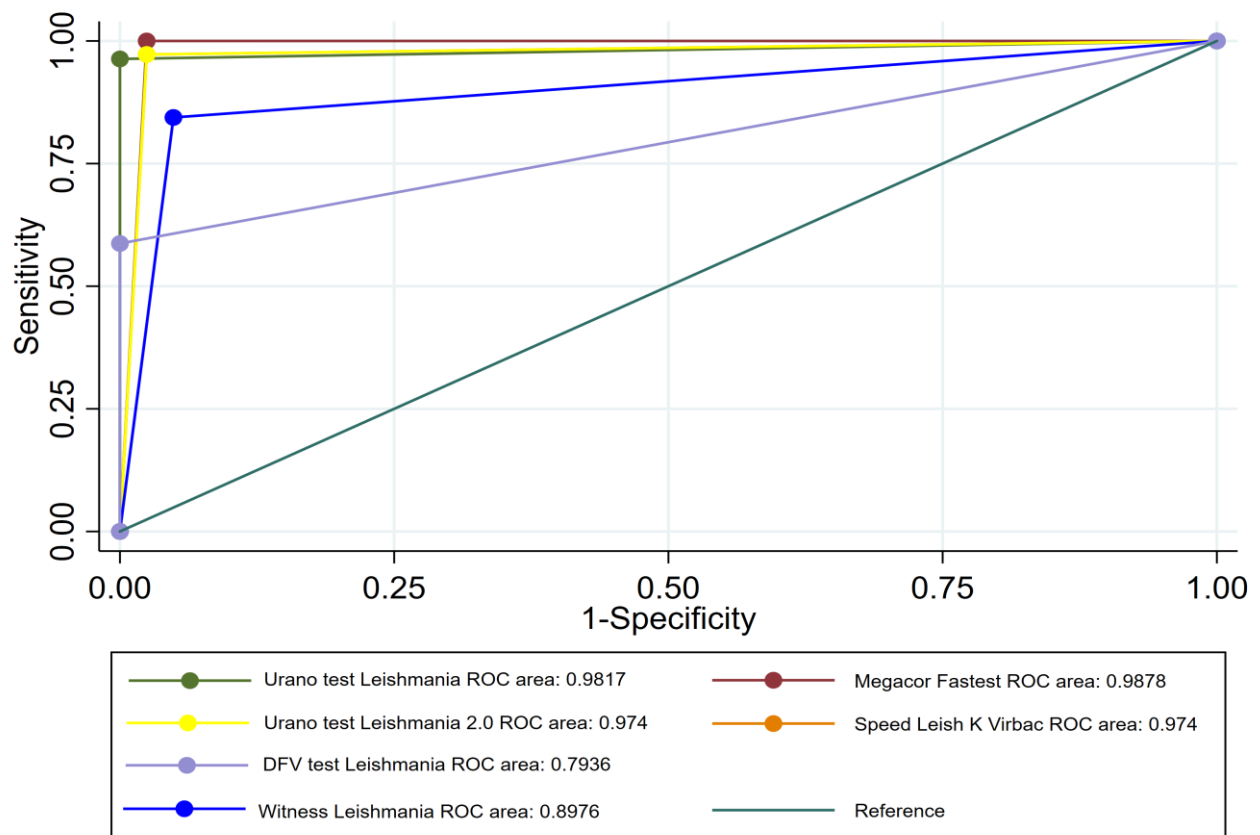
Respecto a la relación entre el estado serológico obtenido por el resultado conjunto de las dos pruebas serológicas de referencia y el resultado de los test evaluados, se observó que las pruebas en general no presentan resultados contradictorios cuando los títulos de los anticuerpos están totalmente ausentes o son muy elevados. No obstante, algunas pruebas mostraron diferencias marcadas con respecto a los resultados obtenidos por las dos pruebas de referencia, especialmente, en aquellas muestras clasificadas con niveles de anticuerpos moderados (**Tabla 2**).

Tabla 2: Resultados del flujo lateral de rK39 según e estado serológico obtenido por el estándar de oro

Test	Resultado	Negativo	Positivo bajo	Positivo medio	Positivo alto
DFV Test <i>Leishmania</i>	Test +	0	10	19	35
	Test-	41	23	20	2
Megacor Fast test	Test +	1	33	39	37
	Test-	40	0	0	0
Speed Leish K Virbac	Test +	1	33	36	37
	Test-	40	0	3	0
Urano test <i>Leishmania</i> 2.0	Test +	1	31	38	37
	Test-	40	2	1	0
Urano test <i>Leishmania</i>	Test +	0	32	36	37
	Test-	41	1	3	0
Witness <i>Leishmania</i>	Test +	2	27	28	37
	Test-	39	6	11	0

Finalmente, en relación al área bajo la curva (curva ROC), la prueba rápida que presentó un mejor rendimiento diagnóstico fue Megacor Fastest (0,987), seguida de las pruebas Uranotest *Leishmania* (0,981), SpeedLeish K (0,974) y Uranotest 2.0 *Leishmania* (0,974). Las pruebas con una menor área bajo la curva ROC fueron Witness *Leishmania* (0,892) y DFV Test *Leishmania* (0,792) (**Figura 2**).

Figura 2: Curva de Característica Operativa del Receptor (ROC) de la prueba de flujo lateral rK39 evaluada



DISCUSIÓN:

Una de las grandes dificultades en la evaluación de las pruebas diagnósticas es la de tener una prueba patrón o *gold standard* sobre la que clasificar las muestras. En este trabajo, la caracterización de las muestras se ha realizado teniendo en cuenta la información clínica del paciente y de las alteraciones de los parámetros de laboratorio, junto a los resultados de varias pruebas de confirmación de la infección por *L. infantum*. En este sentido, esta aproximación es mucho más cercana a la realidad clínica en comparación a la utilización únicamente de los resultados serológicos.

Las técnicas cuantitativas más utilizadas son IFI o ELISA (Maia y Campino, 2008) y, en ellas, hay un punto de corte por encima del cual, se considerará concluyente para confirmar el

diagnóstico (Solano-Gallego et al., 2009). El inconveniente que presentan, frente a los test rápidos, es que se precisa de laboratorio y de material más sofisticado. La principal diferencia entre estas dos pruebas es el tipo de antígeno utilizado y el método técnico para obtener los resultados. En el caso de IFI, todo el parásito está presente en el portaobjetos, mientras que con la técnica ELISA, se utilizan diferentes tipos de antígenos (Basurco et al., 2020).

En el presente estudio, la sensibilidad (0,97) y especificidad (0,98) de SpeedLeish K fueron menores a las indicadas por el fabricante, con valores de 0,98 y 1,00 respectivamente. En el estudio realizado por Solano-Gallego et al. (2014) se empleó un tamaño de muestra mayor (203 perros), utilizaron perros de zonas no endémicas como Londres y caracterizaron las muestras de la misma forma que el presente estudio, dando valores menores de sensibilidad (0,63) y una especificidad que coincide con la indicada por el fabricante (1,00). Según un estudio reciente de Montoya et al. (2021), SpeedLeish K no es capaz de distinguir entre los anticuerpos producidos por la vacuna frente *L. infantum* y los provocados por este. En su estudio, realizaron pruebas con 314 perros y de ellos, dos muestras dieron positivo utilizando este test una vez vacunados, implicando la necesidad de interpretar cuidadosamente los resultados serológicos positivos en perros vacunados antes de considerarlos infectados.

En cuanto a Uranotest los valores obtenidos fueron muy similares con respecto a los indicados por laboratorio referente y, con respecto a Unarotest 2.0, no se puede contrastar la información debido a que el test está aún en estudio y desarrollo.

El test Witness *Leishmania* presenta gran variabilidad en los valores de sensibilidad indicados por el fabricante; sin embargo, en el presente trabajo, esta prueba obtuvo unas medidas de rendimiento baja en relación a la sensibilidad (0,84), pero no con respecto a la especificidad (0,95). El estudio de Rodríguez-Cortes et al. (2013) señala, con un tamaño de muestra menor (60 perros) y con caracterización solo por serología, una sensibilidad bastante baja (0,58) y una especificidad igual a la del fabricante (1,00).

Por otro lado, el test Megacor Fastest presentó mejores valores de sensibilidad a los señalados por el fabricante (1,00 > 0,99), mientras que la especificidad fue igual a la indicada por este (0,98). Tanto en el estudio realizado por Villanueva-Saz et al. (2016) donde se caracterizó las muestras solo por serología y el estudio de Basurco et al. (2020) en el que se determinó las muestras mediante exploración clínica, hematología, bioquímica, urianálisis y electroforesis de proteínas séricas han dado resultado similares a los del fabricante.

Para terminar, el test DFV Test *Leishmania* ha mostrado los resultados más bajos de sensibilidad de todos los test comentados anteriormente (0,73), y dista bastante de la que indica el fabricante (0.93). En el estudio realizado por el propio laboratorio utilizaron muestras de un centro de acogida rural y se seleccionaron solo por serología. La especificidad fue ligeramente mayor en el presente estudio que en el del laboratorio ($1,00 > 0,95$).

Como se ha visto, al existir diferentes clasificaciones y estadios de la enfermedad existen notales diferencias a la hora de clasificar a un perro siguiendo una u otra clasificación, complicando la definición de la selección de muestra y el establecimiento de un posible sesgo (Meléndez-Lazo et al., 2018).

Las diferencias en los resultados diagnósticos obtenidos entre las pruebas rápidas están influenciados por el panel de suero, la tecnología, el tipo de antígeno, el umbral de la prueba y la diferente prueba de laboratorio considerada como ensayo de referencia (Villanueva-Saz et al., 2019), por lo que la estandarización y comparación de los resultados entre test rápidos procedentes de distintos estudios es complicado.

Una posible limitación del presente estudio fue la falta de muestras de perro serológicamente reactivo a otros *Leishmania spp.*, ya que comparten varios antígenos que podrían ocasionar reacción cruzada (Baneth, 2016) y la elección de muestras de zonas no endémicas, ya que en el estudio solo se seleccionaron perros de la ciudad de Zaragoza, que es una zona endémica.

Como se ha comentado anteriormente, en los datos del presente estudio, la especificidad es similar en todos los test evaluados, sin embargo, hay variabilidad en la sensibilidad con datos entre 0,73 y 1,00. Esto conlleva a que se pueda diagnosticar un perro infectado con *L. infantum* como negativo, es decir, se dé un falso negativo. Dependiendo del propósito del test, se debería priorizar o la especificidad o la sensibilidad. Cuando es usado para detectar la infección de *L. infantum* en perros con sospecha clínica, la especificidad y sensibilidad deben de ser altas, pero lo que es más importante, la especificidad no debe de ser demasiado baja porque debe de evitar dar falsos positivos. Por el contrario, una alta sensibilidad es esencial para identificar perros infectados clínicamente sanos (Villanueva-Saz et al., 2019). En caso de sospecha en animales negativos debería de realizarse un método serológico cuantitativo, pues proporcionan un título exacto de anticuerpos anti-*Leishmania*, son más objetivos y se puede realizar un seguimiento de la enfermedad posterior, en caso de que resultara positivo.

No hay que olvidar que los test cualitativos presentan una serie de ventajas como su facilidad de interpretación, su rapidez de uso y no requieren equipamiento sofisticado; por ello, son una herramienta ideal en la clínica (Solano-Gallego et al., 2014).

CONCLUSIONES

El uso de test rápidos inmunocromatográficos en la clínica de manera rutinaria son una opción muy práctica y útil para una primera aproximación a la hora de diagnosticar la enfermedad, sobre todo para identificar perros clínicamente sanos, seropositivos e infectados. El test que mejor rendimiento ha dado ha sido Megacor Fast test con una sensibilidad y especificidad de 1,00 y 0,98 respectivamente. Sin embargo, si el resultado no coincide con la sospecha clínica, no se debe por dar finalizado el diagnóstico definitivo sin antes realizar una prueba cuantitativa como IFI o ELISA para confirmar o descartar la enfermedad, pues cabe la posibilidad de que sea un falso negativo.

Por otro lado, es muy importante que los veterinarios clínicos seleccionen y utilicen aquellos test de inmunocromatografía que se encuentren contrastados de forma independiente como en este trabajo de fin de grado.

CONCLUSIONS

The routine use of immunochromatographic rapid tests in the clinic is a very practical and useful option for a first approach to diagnose the disease, especially to identify clinically healthy, seropositive and infected dogs. The test that has given the best performance has been the Megacor Fast test with a sensitivity and specificity of 1.00 and 0.98 respectively. However, if the result does not match the clinical suspicion, the definitive diagnosis should not be finalized without first performing a quantitative test such as IFA or ELISA to confirm or rule out the disease, as it is possible that it is a false negative.

On the other hand, it is very important that clinical veterinarians select and use those immunochromatography tests that are independently contrasted as in this final degree project.

VALORACIÓN PERSONAL

La elaboración del Trabajo Fin de Grado (TFG) me ha supuesto una fuente de aprendizaje y evolución como estudiante. La propuesta y elección de este trabajo ha generado una oportunidad de poder profundizar bastante en una de las enfermedades más importantes a nivel mundial como es la leishmaniosis, conociendo aspectos relevantes de la misma que antes desconocía.

También me ha aportado el poder conocer otras fuentes de búsqueda de artículos científicos y de investigación y la mejora de lectura y comprensión de artículos en inglés, pudiendo ser de utilidad para la realización de trabajos futuros, así como poder trabajar en un laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcover, M.M., Basurco, A., Fernandez, A., Riera, C., Fisa, R., Gonzalez, A., Verde, M., Garrido, A.M., Ruíz, H., Yzuel, A. y Villanueva-Saz, S. (2021). *A cross-sectional study of Leishmania infantum infection in stray cats in the city of Zaragoza (Spain) using serology and PCR*. *Parasites Vectors* 14, 178.
- Alexander, B. y Maroli, M. (2003). *Control of phlebotomine sandflies*. *Med Vet Entomol*, 17, pp. 1-18.
- Alvar, J, Cañavate, C, Molina, R, Moreno, J y Nieto, J. (2004). *Canine Leishmaniasis*. *Adv Parásito*; 57, pp. 1-88.
- Baneth, G. y Shaw, S.E (2002). *Chemotherapy of canine leishmaniasis*. *Vet. Parasitol.*, 106, pp. 315-324.
- Banneth, G., Aroch, I. (2008). *Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge*. *Vet. J.*, 175, pp. 14-15.
- Baneth, G., Nachum-Biala, Y., Shabat, M., Brenner, O., Gaier, S., Rojas, A, y Yasur-Landau, D. (2016). *Leishmania major infection in a dog with cutaneous manifestations*. *Parasite Vector*, 9, pp. 246.
- Baneth, G., Koutinas, A., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L. (2008). *Canine leishmaniosis: new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two*.
- Barbiéri, CL. (2006). *Immunology of canine leishmaniasis*. *Parasite Immunol*, 28, pp. 329-337.
- Basurco, A., Natale, A., Capello, K., Fernández, A., Verde, MT., González, A., Yzuel, A., Giner, J. y Villanueva-Saz, S. (2020). *Evaluation of the performance of three serological test for diagnosis of Leishmania infantum in dogs using latent class analysis*. *Rev Bras Parasitol Vet*, 29.
- Bianciardi, P., Brovida, C., Valente, M., Aresu, L., Cavicchioli, L., Vischer, C., Giroud, L. and Castagnaro, M. (2009). *Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys*. *Toxicol Pathol*, 37, pp. 770-775.
- Bravo-Grau, S. y Cruz, J.P. (2015). *Estudios de exactitud diagnóstica: herramienta para su interpretación*. *Revista chilena de Radiología*. 21, pp. 158-164.

Carrillo E., Moreno, J. (2009). *Cytokine profiles in canine visceral leishmaniasis*. *Vet.Immunol. Immunopathol*, 128, pp. 67-70.

Cortes, S., Rolao, N., Ramada, J., Campino, L. (2004). *PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using Leishmania donovani s.l. specific kinetoplastid primers*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 98, pp. 12-17.

Cunningham, AC. (2002). *Parasitic adaptive mechanisms in infection by Leishmania*. *Exp Mol Pathol*. 72, pp. 13-141.

DFV Group Divasa-Farmavic (s.f.). *DFV Test Leishmania*.

Ferrer, LM. (1999). *Clinical aspects of canine leishmaniasis*. Canine Leishmaniasis an update. Proceeding of International Canine Leishmaniasis Forum. Barcelona, Spain.pp.6-10.

Ferrer, L., Roura, X. (2010). *Signos clínicos de la leishmaniosis canina*.

Handman, E. (1999). *Cell biology of Leishmania*. *Adv Parasitol*. 4, pp. 1-39.

Handman, E., Bullen, DV. (2002). *Interaction of Leishmania with the hostmacrophage*. *Trends Parasitol*. 18, pp. 332-334.

Hernández, L. (2016). *Estudio de la infección por Leishmania infantum en el perro: utilidad de las técnicas diagnósticas no invasivas y nuevas alternativas terapéuticas*. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Kaszak, I., Planellas, M., Bozena, D. (2015). *Canine leishmaniosis: an emerging disease*.

Maia, C y Campino, L. (2008). *Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection*. *Vet Parásitol*, 158, pp. 274-287.

Manna L, Reale S, Vitale F, Picillo E, Pavone LM y Gravino AE (2008). *Real-time PCR assay in Leishmania-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol*. *Vet J*, 177(2), pp. 279-282.

Megacor Diagnostik (s.f). *FASTest Leish*.

Meléndez-Lazo, A., Ordeix, L., Planella, M., Pastor, J. y Solano-Gallego, L. (2018). *Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with Leishmania infantum: comparisson of five diferent clinical classification systems*. *Res vet Sci*, 117, pp. 18-27.

Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H. and Deplazes, P. (2005). *Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent-antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic Leishmania infections in dogs*. *J Clin Microbiol*, 43, pp. 5515-5519.

Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad (2012). *Evaluación del riesgo de transmisión de Leishmania infantum en España*.

Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Oliva, G. and Baneth, G. (2008). *Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two*. *Trends in Parasitology* 24, pp. 371–377.

Miró, G. (2013). *Tratamiento y pronóstico*. En: *Leishmaniosis*. Una revisión actualizada (ed. Servet), 8, pp. 151-164.

Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V. and Montoya, A. (2014). *Current status of L. infantum infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis?* *Parasit Vectors*, 7 pp. 112.

Montoya, A., Checa, R., Marino, V., Gálvez, R., Portero, M., De Mari, K., Navarro, C. y Miró, G. (2021). *Antibodies elicited by the CaniLeish vaccine: long-term clinical follow-up study of dogs in Spain*. *Parasitol Res*, 120, pp. 1471-1479.

Moreira, M, Luvizotto, M, Garcia, J, Corbett, C, Laurenti, M. (2007). *Comparasion of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs*. *Vet Parásitol*, 145, pp. 245-252.

Noli, C. y Auxilia, S.T. (2005). *Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review*. *Vet Dermatol*, 16, pp. 213-232.

Noli, C. y Saridomichelakis, M.N. (2014). *An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniasis caused by Leishmania infantum*. *Vet. J.*, 202, pp. 425-435.

Ortega Hernández, P. (2016). *Diagnóstico de la leishmaniosis visceral canina: Estudio comparativo de diferentes pruebas diagnósticas para su utilización en estudios epidemiológicos*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.

- Otranto, D., Paradies, P., Sasanelli, M., Leone, N., de Caprariis, D., Chirico, J., Spinelli, R., Capelli, G. and Brandonisio, O. (2005). *Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniasis*. *J Vet Diagn Invest*, 17, pp. 32-37.
- Ramírez Macías, M. I. (2012). *Búsqueda de nuevos fármacos de actividad antiparasitaria frente a Leishmania spp y Trypanosoma cruzi*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Reguera, R.M., Morán, M., Pérez-Pertejo, Y., García-Estrada, C., Balaña-Fouce, R. (2016). *Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis*. *Vet Parasitol*, 227, pp. 98-114.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., López-Fuertes, L., Timón, M., Altet, L., Solano-Gallego, L., Sánchez-Robert, E., Francino, O., Alberola, J. (2007). *A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis*. *Int J Parasitol*;37, pp. 683-693.
- Rodríguez-Cortés, A., Ojeda, A., Todoli, F., Alberola, J. (2013). *Performance of commercially available serological diagnostic tests to detect Leishmania infantum infection on experimentally infected dogs*. *Vet Parasitol*.
- Schallig, HD., Canto-Cavaleiro, M. y da Silva, ES. (2002). *Evaluation of the direct agglutination test and the rK39 dipstick test for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(7), pp. 1015-1018.
- Solano-Gallego, L., Baneth, G., (2008). *Canine leishmaniosis: a challenging zoonosis*. *Eur. J. Companion Anim. Pract.* 18, pp. 232-241.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bpurdeau, P., Oliva, G., Baneth, G. (2009). *Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis*. *Vet Parasitol*, 165, pp. 1-18.
- Solano-Gallego, L., Villanueva-Saz, S., Carbonell, M., Trotta, M., Furlanello, T., Natale, A. (2014). *Serological diagnosis of canine leishmaniosis: comparison of three commercial ELISA tests (Leiscan®, ID Screen® and Leishmania 96®), a rapid test (Speed Leish K®) and an in-house IFAT*. *Parasit Vectors*, 7, pp. 111.
- Tafuri, W., Santos, R., Arantes, R., Gonçalves, R., Melo, M., Michalick, M., Tafuri, W. (2004). *An alternative immunohistochemical method for detecting Leishmania amastigotes in paraffin-embedded canine tissues*. *J Immunol Methods*, 292 (1-2), pp. 17-23.

Torres, M., Bardagí, M., Roura, X., Zanna, G., Ravera, I. and Ferrer, L. (2011). *Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol*. *Vet J*, 188, pp. 346-351.

Uranotest (s.f). *Uranotest Leishmania*.

Villanueva-Saz, S., Martín, V., Loste, A., Ripolles, D., Marca, C., Fernández, A., Verde, MT. (2016). *FASTest® Leish : evaluation of an immunochromatographic test compared to a reference serological technique for the detection of anti-leishmania infantum canine antibodies*.

Villanueva-Saz, S., Basurco, A., Martín, V., Fernández, A., Loste, A., Verde, M.T. (2019). *Comparison of a qualitative immunochromatographic test with two quantitative serological assays for the detection of antibodies to Leishmania infantum in dogs*. *Acta Veterinaria Scandinavica*.

Velez, R. y Gállego M. (2020). *Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy*. *TMIH*, 25, pp. 540-557.

Virbac BVT (s.f). *Speed Leish K*.

Xavier, S, Anrdade, H, Haddad, S, Chiarelli, I, Lima, W, Michalick, M, Tafuri, W. (2006). *Comparision of paraffinembedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detecting Leishmania infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods*. *BMC Vet Res*. 2 (1), pp. 17.

Woerly, V., Maynard, L., Sanquer, A. and Eun, H.M. (2009). *Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis*. *Parasitol Res*, 105, pp. 463-469.

Zoetis (s.f). *Witness Liehsmania*.